

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química

**Extração no Ponto Nuvem para Determinação de  
Cádmio e Chumbo em Amostras Biológicas por  
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de  
Grafite**

Relatório Final de Estágio  
(QMC 5510)

Estagiária: Tatiane de Andrade Maranhão

Orientador: Prof. Dr. Adilson José Curtius

Florianópolis, SC

2004

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas  
Departamento de Química

**Extração no Ponto Nuvem para Determinação de  
Cádmio e Chumbo em Amostras Biológicas por  
Espectrometria de Absorção Atômica em Forno de  
Grafite**

Relatório Final de Estágio  
(QMC 5510)

Estagiária: Tatiane de Andrade Maranhão

Orientador: Prof. Dr. Adilson José Curtius

Florianópolis, SC

2004

Para minha adorável mãe  
pelo apoio, compreensão, amor e  
belas lições.

## **Agradecimentos**

A Deus por ter me iluminado e protegido, por estar guiando meu caminho como futura química sendo de extrema importância nas minhas decisões e atitudes em todos os campos de minha vida.

Ao professor Dr. Adilson José Curtius pela orientação, pelo grande exemplo de como ser um profissional sério, competente e ético, obrigada pela confiança e presteza a mim confiadas.

À professora Dra. Márcia A. Mesquita Silva da Veiga, pela oportunidade de trabalhar com extração no ponto nuvem, por sua amizade e carinho.

Ao professor Dr. Bernhard Welz e à professora Dra. Vera Lúcia Azzolin Frescura pelas valiosas contribuições e pronta ajuda, pelo carinho e amizade.

Aos melhores amigos de trabalho que alguém pode ter: Lúcia, Alessandra, Anderson, Gilson, Jairo, Mariana, Jesse, Fábio, Tatiana que foi minha co-orientadora em outros trabalhos também de extrema importância na minha vida, Daiane, Charles, Ingrid, e por que não, nosso adorável mineiro Fred, a todos, obrigada pelo apoio, pela amizade e por tornarem o ambiente de trabalho sempre tão alegre, agradável e estimulante.

Aos professores do Departamento de Química.

Aos meus inesquecíveis amigos dos laboratórios 312/314, que permanecem em minha vida : Xande, Karin, Viviane, Adri, Bethânia, Lili, Salete, Karina, Rogério, Thalia, Inês e a professora Dra. Tereza Cristina pela primeira orientação e amizade.

A todos os amigos que cultivei no curso, em especial à Renata, sempre pronta a me escutar, estivemos juntas em toda trajetória do curso, a minha “irmã” Aline por todos belos momentos vividos e também sua família, a todos os amigos que estão constantemente em minha vida, somando, permitindo enriquecer minha jornada apenas com sua presença em meu dia a dia.

Ao Daniel agradeço não só pela maravilhosa co-orientação, com quem muito aprendi, mas também pelos muitos anos de amizade e carinho que nos une numa mesma família.

Ao meu adorável pai, Alcêdo, que não mais presente sempre serviu de inspiração no mundo da ciência, servindo de exemplo e deixando imensa saudade...

A minha amada família: Maria, minha mãe a quem jamais terei dito obrigada o suficiente por todo amor e compreensão a mim oferecido, ao meu irmão Júnior que pacientemente suportou meus maus momentos, meus tios e primos atualmente distantes fisicamente, mas presentes em pensamento, a minha avó que tanto amo. A Beta e Amanda, o meu muito obrigada por serem minha família.

Aos amigos próximos Amauri, Vilson, Dr. Fábio e família, Aldrovando, Edson, as amigas da biblioteca setorial, Ninna, Selma, Tânia e a todos que abrilhantam minha caminhada estando ao meu lado.

Aos meus amigos formandos 2004/2.

Aos meus amigos distantes que jamais deixaram de me apoiar e torcer por mim, Rodrigo, Lillian, Jana, Dinho, Marcus...amo todos vocês.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Desde já agradeço a banca avaliadora deste trabalho.

Agradeço novamente a Deus, por acreditar que sem ele não se pode ser feliz...

## ÍNDICE GERAL

<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>i</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>ii</b>
<b>Lista de Abreviaturas .....</b>	<b>iii</b>
<b>Resumo.....</b>	<b>iv</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Cádmio e chumbo .....	1
1.2.Extração no ponto nuvem.....	2
1.3. Espectrometria de absorção atômica .....	5
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>7</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>8</b>
3.1. Instrumentação.....	8
3.2. Reagentes, padrões e materiais certificados.....	9
3.3. Procedimento de preparação das amostras.....	9
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>11</b>
4.1. Curvas de pirólise e atomização.....	11
4.2. Condições de complexação.....	14
4.3. Parâmetros de mérito e resultados.....	17
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>19</b>
<b>6. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>20</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

1. Diagrama de fases do surfactante Triton X-114 em água.....	3
2. Representação estrutural do surfactante Triton X-114.....	3
3. Representação estrutural do ligante DDTP .....	4
4. Curvas de temperatura de pirólise e atomização para Cd e Pb em BCR 397, após a extração no ponto nuvem.....	11
5. Curvas de pirólise para Cd em diversos meios: com DDTP 0,5 % m/v, com 0,24 µg do modificador fosfato e nas amostras digeridas NIST 8414 músculo bovino e GBW 09101 cabelo humano (não submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem) .....	13
6. Influência da concentração de DDTP na absorvância integrada de Cd e Pb em amostra de cabelo BCR 397 submetida à extração no ponto nuvem.....	15
7. Influência da concentração de HCl na absorvância integrada de Cd e Pb em amostra de cabelo BCR 397 após a extração no ponto nuvem.....	15
8. Influência da concentração de Triton X-114 na absorvância integrada de Cd e Pb em amostra certificada de cabelo BCR 397 após a extração no ponto nuvem.....	16

## ÍNDICE DE TABELAS

1. Tabela comparativa entre as técnicas de extração líquido-líquido.....	5
2. Programa de temperaturas do forno de grafite para a determinação de Cádmio e Chumbo .....	8
3. Limites de detecção, fatores de enriquecimento, coeficiente de correlação e inclinação das curvas de calibração para o método proposto.....	17
4. Valores obtidos de concentração para Cd e Pb em amostras biológicas certificadas submetidas à extração no ponto nuvem.....	18



## LISTA DE ABREVIATURAS

DDTP.....	O, O- dietilditiofosfato de amônio
CPE.....	Extração no Ponto Nuvem
CMC.....	Concentração de micelar crítica
LLE.....	Extração líquido-líquido
SPE.....	Extração em fase-sólida
SPME.....	Microextração em fase sólida
F AAS.....	Espectrometria de absorção atômica em chama
ET AAS .....	Espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica

## Resumo

O fenômeno de separação de fases de surfactantes não-iônicos em soluções aquosas foi utilizado para extração de cádmio e chumbo em amostras biológicas digeridas. Após a complexação com *O,O*- dietilditiofosfato (DDTP) em meio acidificado com ácido clorídrico, os analitos são quantitativamente extraídos para a fase rica no surfactante não-iônico octilfenoxipolietoxietanol (Triton X-114) após aquecimento e centrifugação. Metanol acidificado com  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$  foi adicionado à fase rica em surfactante para posterior análise por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS). As concentrações de DDTP, Triton X-114 e ácido clorídrico adotadas foram todas otimizadas, e as temperaturas de atomização de  $1500^\circ\text{C}$  e  $1700^\circ\text{C}$  foram adotadas para Cd e Pb respectivamente. As análises procederam-se sem o uso de modificadores, uma vez que os analitos apresentaram considerável estabilidade térmica promovida pelo próprio meio. Uma investigação mais detalhada foi realizada para determinar quais componentes na extração são responsáveis pela alta estabilidade térmica obtida, o que revelou que o DDTP adicionado e o fósforo naturalmente presente nas amostras digeridas contribuem significativamente para este fenômeno. Limites de detecção ( $3\sigma_B$ ) de  $6 \text{ ng g}^{-1}$  e  $40 \text{ ng g}^{-1}$ , assim como fatores de enriquecimento de 129 e 18 para Cd e Pb, respectivamente, foram obtidos. O procedimento proposto foi aplicado à análise de cinco amostras biológicas certificadas após digestão por microondas em mistura de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{HNO}_3$ . Para validação do método foi feita a comparação com os valores certificados, resultando em boa concordância com os valores para 95% de nível de confiança.

## 1. Introdução

### 1.1. Cádmio e chumbo

Um dos aspectos relevantes da presença de metais traço em amostras biológicas é devido a seus efeitos potencialmente tóxicos aos organismos vivos. Cádmio e chumbo são classificados como metais tóxicos que tendem a se concentrar em sistemas ambientais e animais.<sup>1</sup> Por serem elementos com efeito cumulativo, atuam como agentes carcinogênicos causando vários distúrbios a organismos vivos. Absorção do ar no ambiente local e a ingestão de alimentos contaminados pela presença de metais em solos são as maiores fontes da exposição humana.<sup>1</sup> A presença destes elementos tóxicos no meio ambiente permite a entrada dos mesmos na cadeia alimentar. A concentração base de chumbo em solos sem contaminação está na faixa de 10-50 ppm; em solos com baixo nível de contaminação a concentração de Pb é cerca de 30 a 100 mg kg<sup>-1</sup>.<sup>1,4</sup> A concentração de Pb em solos usados para agricultura cresceu rapidamente em algumas áreas no mundo, tendo sido encontrado até 2 % de Pb acumulado na superfície do solo exposto a várias fontes de poluição.<sup>1-6</sup> A exposição é obviamente dependente da emissão destes elementos, e pode ser particularmente séria em alguns casos; por exemplo, 50% do Cd inalado é absorvido, concentrando-se no fígado e rins.<sup>2</sup> Estudos comprovam que o chumbo acumula-se em ossos e em alguns tecidos moles, como fígado, rins e cérebro, enquanto que o cádmio é extremamente danoso a órgãos como rins, fígado e pulmões.<sup>1,3</sup>

A análise de cabelo humano é particularmente interessante, uma vez que a determinação de elementos tóxicos neste tipo de amostra tem sido usada como índice biológico no monitoramento de poluição ambiental, avaliação de envenenamento por metais pesados ou presença de doenças específicas.<sup>1,4</sup>

Devido a esta toxicidade, o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação a nível de traço e ultra-traço de Cd e Pb em amostras ambientais e biológicas tem sido de grande interesse.<sup>7</sup> Embora o uso de Cd e Pb ao longo dos séculos tenha diminuído, a deposição ocorrida no século XX permite que a concentração destes continue aumentando no ecossistema terrestre e

aquático, portanto expondo o homem e a vida selvagem a níveis críticos destes elementos.<sup>8</sup>

### **1.2. Extração no Ponto Nuvem (CPE)**

Os surfactantes são substâncias tensoativas, formadas por moléculas anfifílicas. Uma molécula anfifílica possui em sua estrutura duas regiões bem definidas, uma de caráter hidrofóbico (porção apolar) e outra de caráter hidrofílico (porção polar). De acordo com o grupo podem dividir-se em aniônicos, catiônicos, não iônicos ou zwitteriônicos.<sup>9</sup>

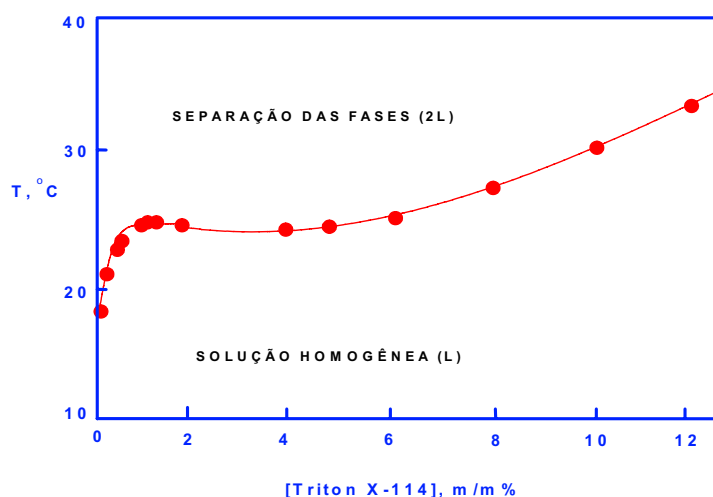
Sistemas micelares formados em soluções aquosas de surfactantes têm sido empregados com sucesso em quase todas as faces da química analítica, desde aplicações em espectroscopia e química eletroanalítica à ciência da separação, com objetivo de melhorar métodos existentes e desenvolver novos procedimentos analíticos.<sup>9-12</sup> Uma das mais importantes e práticas aplicações das micelas envolve o seu uso no processo de separação.<sup>12</sup>

A determinação de elementos traço em amostras biológicas é particularmente difícil, devido à usual alta complexidade da matriz e à baixa concentração destes elementos nestas amostras, o que requer uma técnica instrumental sensível e muitas vezes uma etapa de pré-concentração. A extração líquido-líquido clássica e os métodos de separação convencionais consomem normalmente muito tempo e labor intensivo, além de requerer volumes relativamente grandes de solventes com alta pureza. Um problema adicional refere-se ao tratamento destes solventes utilizados, uma vez que solventes orgânicos podem gerar severos problemas ambientais. Neste sentido, a extração no ponto nuvem é uma alternativa interessante e eficiente, uma vez que reduz o consumo e a exposição a solventes, custos com tratamento de resíduos e tempo de extração.<sup>7</sup>

O fenômeno de ponto nuvem tem sido usado na ciência de separação para extração, purificação e pré-concentração. Este é baseado no comportamento de surfactantes não-iônicos em soluções aquosas, que exhibe a separação de fases com o aumento da temperatura ou com a adição de um agente, normalmente um sal.<sup>13,14</sup> Esta técnica tem sido empregada na remoção de poluentes orgânicos, como os pesticidas, compostos orgânicos

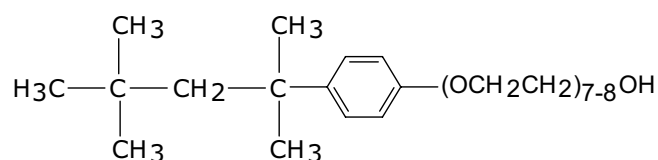
policlorados, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) e fenóis<sup>15-18</sup> e como uma técnica de extração anterior à determinação de vitaminas<sup>19</sup>, drogas medicinais<sup>20</sup> e proteínas.<sup>21</sup> Esta técnica também foi usada com sucesso no tratamento de amostras ambientais contaminadas, particularmente de águas e solos<sup>22</sup>.

Uma característica de soluções aquosas de surfactantes não iônicos consiste na turbidez que é observada quando a temperatura é aumentada em uma estreita faixa de temperatura, referida como ponto nuvem. O diagrama de fases do surfactante Triton X-114, utilizado neste trabalho, encontra-se exposto na Figura 1.<sup>9</sup>



**Figura 1.** Diagrama de fases do surfactante octilfenoxipoliétoxietanol (Triton X-114).<sup>9</sup>

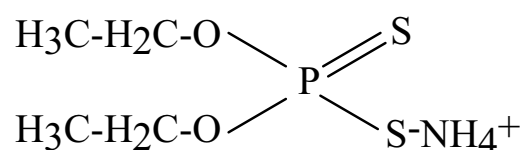
O surfactante utilizado neste trabalho, o octilfenoxipoliétoxietanol, encontra-se mostrado na Figura 2.



**Figura 2.** Estrutura do surfactante não iônico octilfenoxipoliétoxietanol (Triton X-114).

Em temperaturas acima do ponto nuvem, o sistema separa-se em duas fases isotrópicas. Uma das fases consiste de uma solução diluída do surfactante não iônico quase livre de micelas a uma concentração igual a sua concentração micelar crítica (cmc), e uma fase rica em surfactante que aparece apenas quando a solução está acima do seu ponto nuvem.<sup>9</sup>

Elementos metálicos como Cd, Pb e mesmo alguns ametais como As podem ser extraídos para a fase rica em surfactante sob a forma de complexos hidrofóbicos formados entre os íons do elemento e um agente quelante apropriado sob condições adequadas de pH. O procedimento empregado previamente<sup>13,23</sup> envolve a reação de complexação entre o sal de amônio de O,O-dietilditiofosfato (DDTP), cuja estrutura é mostrada na Figura 3, e o analito de interesse em meio ácido. A extração no ponto nuvem é realizada após a adição de um pequeno volume de Triton X-114.



**Figura 3.** Estrutura do ligante O,O-dietilditiofosfato de amônio (DDTP).

As etapas de extração e pré-concentração que se baseiam na separação de fases utilizando o fenômeno do ponto nuvem oferecem uma alternativa conveniente aos sistemas de extração convencionais, como extração líquido-líquido (LLE), extração em fase-sólida (SPE) e microextração em fase sólida (SPME). Entre as vantagens inclui-se excelente pré-concentração com a alta eficiência de extração, além de requerer pequenas quantidades do surfactante não-iônico, trazendo benefícios em termos de custo e segurança.<sup>24</sup>

A Tabela 1 descreve vantagens e desvantagens das técnicas de extração mais usualmente empregadas para amostras líquidas.

**Tabela 1.** Comparação entre as principais técnicas de extração utilizadas para amostras líquidas.<sup>24</sup>

	<b>LLE</b>	<b>SPE</b>	<b>SPME</b>	<b>CPE</b>
<b>Breve descrição</b>	O analito é fracionado entre dois solventes imiscíveis	O analito é retido em um adsorvente sólido	Equilíbrio de partição entre fase estacionária polimérica e a matriz da amostra	Analito é fracionado entre duas fases isotrópicas, fase “rica em surfactante” e fase aquosa
<b>Tempo de extração</b>	Cerca de 24 h	20-30 min	Cerca de 60 min	20 min
<b>Solvente usado</b>	Solventes orgânicos	Solventes orgânicos	Nenhum	Solução de surfactante
<b>Custo</b>	Baixo	Relativamente baixo	Relativamente baixo	Baixo
<b>Operação</b>	Fácil	Relativamente fácil	Relativamente fácil	Fácil
<b>Desvantagens</b>	Grande consumo de solvente e concentração de amostra requerida após extração	Retenção insuficiente de muitos compostos polares e seletividade limitada	Escolha da fibra e otimização do procedimento	Otimização das condições de operação

### 1.3. Espectrometria de Absorção Atômica

Uma aplicação prática do fenômeno ponto nuvem é a extração de quelatos metálicos, para posterior quantificação usando uma técnica de espectrometria atômica. A espectrometria de absorção atômica em chama (F AAS) é a técnica mais amplamente empregada na detecção de analitos após extração no ponto nuvem.<sup>25-28</sup> Entretanto, mesmo sendo F AAS uma técnica que apresenta vantagens, especialmente no que diz respeito ao tempo de análise, o uso de técnicas mais sensíveis torna-se interessante pois pode reduzir consideravelmente os limites de detecção para diversos elementos, permitindo quantificar de forma precisa e exata suas concentrações em amostras nas quais a concentração encontra-se em nível de ppb ou sub-ppb.<sup>9</sup>

A espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (ET AAS) pode, neste sentido, combinar todos os benefícios associados à

extração no ponto nuvem e ao uso de uma técnica instrumental sensível. ET AAS permite reduzir de forma eficiente a matriz proveniente da própria amostra e do surfactante, durante o aumento gradual de temperatura antes da atomização do analito com a utilização de um programa de temperatura otimizado. Este fato, adicionado ao maior tempo de residência e maior eficiência de atomização, proporciona uma melhora na sensibilidade de cerca de 2-3 ordens de magnitude em relação à F AAS.<sup>30</sup>



## **2. Objetivos**

O objetivo inicial deste trabalho foi a determinação de Cd e Pb em amostras biológicas de matrizes complexas digeridas com auxílio de microondas por ET AAS, usando dietilditiofosfato de amônio como agente quelante e Triton X-114 como surfactante não-iônico, sem o uso de modificador químico. Como objetivo específico foi verificada a estabilidade dos analitos frente aos reagentes utilizados na extração e a relação entre a estabilidade alcançada e o teor de fósforo naturalmente presente na amostra e a concentração ótima de cada reagente utilizado no procedimento de pré-concentração (Triton X -114, DDTP e HCl). Com o intuito de verificar a exatidão do método, cinco materiais de referência certificados foram submetidos ao procedimento de pré-concentração desenvolvido para quantificação de Cd e Pb.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Instrumentação

Um espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 100 (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA), equipado com atomizador em forno de grafite HGA 800 e amostrador automático AS-72 foi utilizado em todos os experimentos. A correção de fundo foi efetuada com lâmpada de arco de deutério. Todas as medidas foram efetuadas utilizando absorvância integrada (área de pico). Lâmpadas de cátodo oco de Cd e Pb (Perkin Elmer) foram operadas, respectivamente, a 4 mA e 10 mA. Os comprimentos de onda de 228,8 nm e 283,3 foram selecionados para Cd e Pb, respectivamente. Um volume de 20 µL de todas as amostras e soluções de calibração foi injetado diretamente no tubo de grafite por meio do amostrador automático. Argônio 99,996 % (White Martins, São Paulo) foi utilizado como gás de proteção e de purga. Tubos de eletrografite policristalino recobertos com grafite pirolítico e plataformas de grafite pirolítico (Perkin Elmer) foram utilizados. O programa de temperaturas do forno de grafite é mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Programa de temperaturas do forno de grafite para determinação de Cd e Pb em amostras biológicas submetidas à extração no ponto nuvem.

Etapa	Temperatura / °C	Rampa / s	Permanência / s	Ar / mL min <sup>-1</sup>
Secagem I	90	10	15	250
Secagem II	130	15	15	250
Pirólise	700	5	25	250
Resfriamento	20	1	5	250
Atomização*	1500 <sup>a</sup> , 1700 <sup>b</sup>	0	5	0
Limpeza	2300	1	5	250

\* Etapa de Leitura

<sup>a,b</sup> Temperaturas para Cd e Pb, respectivamente

A digestão por microondas das amostras foi realizada em forno digestor MLS-1200 MEGA (Milestone, Sorisole, Itália), utilizando programa de cinco

etapas: 2 min em 250 W, 2 min em 0 W, 6 min em 250 W, 5 min em 400 W e 5 min em 650 W, seguido por 5 min de ventilação.

### **3.2 Reagentes, padrões e materiais certificados**

Todos os reagentes utilizados possuíam no mínimo grau analítico de pureza. Água foi deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) a uma resistividade de 18,2 M $\Omega$  cm. Ácido clorídrico 37% (Merck, Darmstadt, Alemanha), ácido nítrico 65 % (*Suprapur*<sup>®</sup>, Merck) e metanol (Carlo Erba, Milão, Itália) foram bi-destilados abaixo da temperatura de ebulição em destiladores de quartzo (Kürner Analysentechnik, Rosenheim, Alemanha). Peróxido de hidrogênio 30 % (*Suprapur*<sup>®</sup>, Merck), O,O-dietilditiofosfato de amônio (Aldrich, Milwaukee, WI, EUA), diidrogenofosfato de amônio (Merck) e Triton X-114 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) foram utilizados sem purificação prévia.

Os materiais certificados usados para validação do método foram: BCR 278 R-tecido de mexilhão, BCR 397-cabelo humano e BCR 186-rim de porco (da Community Bureau of Reference, Brussels, Belgium); NIST 8414-músculo bovino (do National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) e finalmente, GBW 09101 cabelo humano (do Shanghai Institute of Nuclear Research, Shanghai, China).

### **3.3 Procedimento de preparo das amostras**

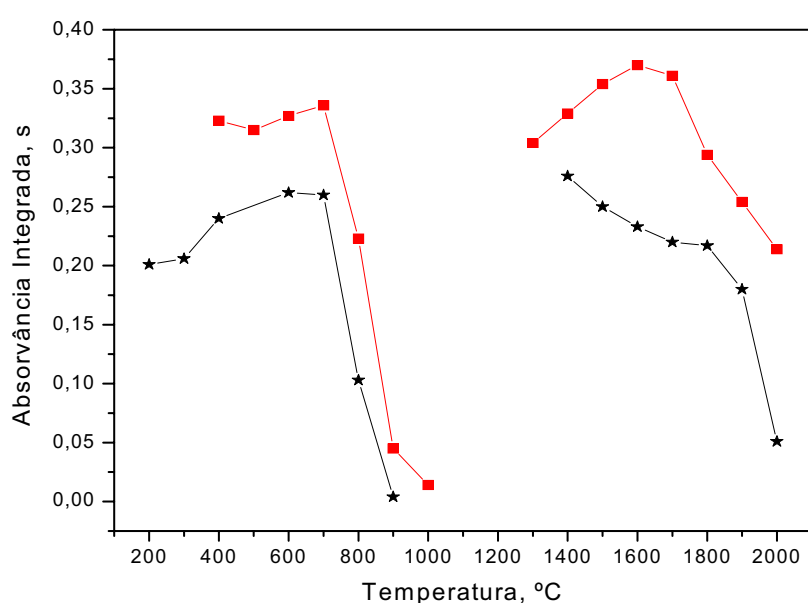
As amostras foram pesadas diretamente em frascos de PTFE em alíquotas contendo aproximadamente 250 mg de BCR 278R, BCR 397 e BCR 186 ou 500 mg da NIST 8414 e GBW 09101. Alíquotas de 3,0 mL de HNO<sub>3</sub> e 1,0 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram adicionadas a cada alíquota de amostra, exceto para NIST 8414 e GBW 09101, para as quais estes volumes foram dobrados. A mistura foi submetida ao programa de digestão por microondas previamente descrito. As amostras digeridas foram transferidas para frascos de polipropileno de 50 mL (Sarstedt, Nümbrecht, Alemanha) e diluídas a este volume com água deionizada, sendo mantidas sob refrigeração até o uso.

O procedimento de pré-concentração iniciou-se com a adição de HCl 37% m/v bi-destilado com concentração otimizada de  $0,32 \text{ mol L}^{-1}$  para as alíquotas contendo 1-5 mL de amostra digerida, de acordo com a concentração esperada nas amostras, em frascos de polipropileno de 15 mL (Sarstedt). Uma solução estoque de DDTP foi preparada e o ligante foi adicionado às amostras até que fosse atingida a concentração otimizada de 0,5 % m/v para cada analito. Finalmente, Triton X-114 na com concentração otimizada de 0,1 % v/v foi adicionado, e o volume foi completado a 15 mL com água deionizada. A solução final foi então aquecida em banho-maria a  $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 20 min. A separação de fases foi acelerada pela centrifugação dos tubos a 3500 rpm por 20 min. A fase rica em surfactante tornou-se viscosa após imersão dos tubos em banho de gelo por 10 minutos, permitindo a eliminação da fase aquosa pela simples inversão dos tubos. Resíduos de água foram removidos com auxílio de uma pipeta de Pasteur. Para reduzir a viscosidade do extrato e permitir a análise por ET AAS, 500  $\mu\text{L}$  de metanol acidificado com  $\text{HNO}_3$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foram adicionados e alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  da solução resultante foram pipetadas diretamente no forno de grafite e submetidas ao programa de temperaturas mostrado na Tabela 2. A calibração foi realizada com padrões aquosos submetidos ao mesmo procedimento de extração ao qual foram submetidas as amostras. Um “branco” submetido ao mesmo procedimento foi medido paralelamente a todas as amostras e soluções de calibração.

## 4. Resultados e discussão

### 4.1. Curvas de pirólise e atomização

As curvas de pirólise e atomização foram estabelecidas usando o material de referência BCR 397 (cabelo humano), submetido ao procedimento de extração no ponto nuvem. Alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  do extrato final em metanol foram pipetadas no tubo de grafite. A Figura 4 mostra o perfil das curvas de pirólise e atomização para Cd e Pb.



**Figura 4.** Curvas de pirólise e atomização para Cd (—★—) e Pb (—■—) em BCR 397 (cabelo humano) após extração no ponto nuvem. DDTP 0,5 % m/v, Triton X-114 0,1 % v/v, HCl 0,32 mol L<sup>-1</sup>.

As curvas mostram que os analitos nos extratos apresentam-se estáveis até uma temperatura de pirólise de 700 °C, e as temperaturas de atomização otimizadas foram de 1500 °C e 1700°C para Cd e Pb respectivamente, sem adição de nenhum modificador químico, o que mostra uma considerável estabilização promovida pelo próprio meio.

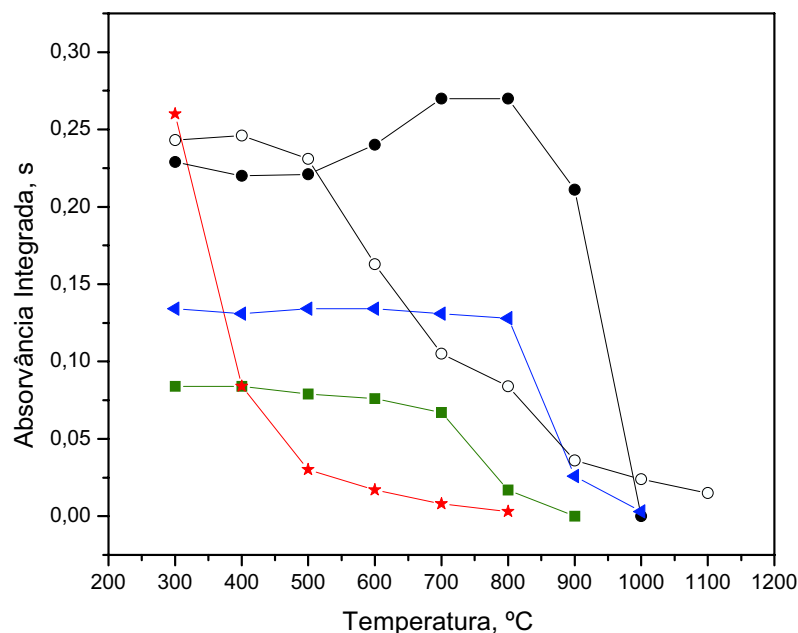
Temperaturas de pirólise abaixo de 600 °C não podem ser utilizadas, pois os concomitantes não são eliminados de forma eficiente nestas condições,

gerando fundo considerável e como consequência valores incorretos de absorvância para os analitos. Este efeito é mais pronunciado para o Cd, resultando em um considerável decréscimo na absorvância para baixas temperaturas antes da chegada ao platô, como mostra a Figura 4. O tempo de rampa na etapa de pirólise foi ajustado para permitir a eliminação gradual da matriz, evitando possíveis perdas do analito causadas por um aumento súbito de temperatura. A etapa de limpeza do programa do forno foi ajustada para uma temperatura mais elevada, com intuito de evitar a deposição do metal na superfície da plataforma de grafite. Estes comentários são aplicáveis a todas as amostras analisadas, como pôde ser observado em testes posteriores.

A Figura 4 mostra que uma estabilização térmica significativa foi obtida particularmente para o Cd, para o qual a máxima temperatura de pirólise para soluções aquosas sem o uso de modificador é de 300 – 400 °C<sup>29</sup>. As medidas nos extratos, após procedimento de extração no ponto nuvem, permitiram o uso de até 700 °C como temperatura de pirólise sem perda significativa de analito.

Com o intuito de investigar a estabilização dos analitos observada nas análises, obtiveram-se curvas de pirólise avaliando-se a influência de cada componente envolvido na extração no ponto nuvem isoladamente.

Foram analisadas soluções contendo Cd na concentração de 1,0 µg L<sup>-1</sup> em metanol, com DDTP, com Triton X-114 e com HCl, mantendo-se as concentrações otimizadas para o procedimento de extração (DDTP 0,5 % m/v, Triton X-114 0,1 % v/v, HCl 0,32 mol L<sup>-1</sup>). Avaliou-se o comportamento de duas das amostras certificadas, NIST 8414 e GBW 09101, após digestão, sem serem submetidas ao procedimento de pré-concentração, além de se comparar com o comportamento de uma solução aquosa com uso de modificador fosfato, (NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>. A Figura 5 mostra os resultados obtidos na investigação da estabilidade térmica do Cd.



**Figura 5.** Curvas de pirólise para Cd em diversos meios: solução aquosa com  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd (—★—), solução aquosa com  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd adicionada de DDTP 0,5 % m/v (—◀—), solução aquosa com  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  Cd usando modificador fosfato, 0,24  $\mu\text{g}$  (—●—), e as amostras digeridas NIST 8414 músculo bovino (—■—) e GBW 09101 cabelo humano (—○—) não submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem. Temperatura de atomização:  $1500^\circ\text{C}$ . DDTP 0,5 % m/v, Triton X-114 0,1 % v/v, HCl  $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ .

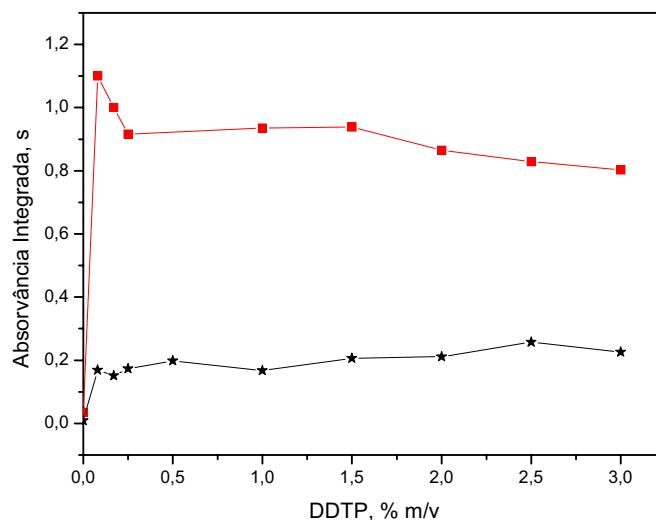
Observou-se que, de fato, para a solução aquosa acidificada, a temperatura de pirólise máxima obtida foi de  $300^\circ\text{C}$  sendo que todas as outras curvas mostraram maior estabilidade térmica. O estudo mostrou, primeiramente, uma considerável contribuição do DDTP para a estabilidade térmica do analito, uma vez que a solução de Cd contendo 0,5 % m/v de DDTP (sem o processo de pré-concentração) permitiu uma temperatura máxima de pirólise de  $800^\circ\text{C}$ . Amostras biológicas são normalmente ricas em fósforo, que pode agir como modificador químico, permitindo uma maior estabilidade térmica. Esta possibilidade foi investigada avaliando o comportamento de três diferentes curvas, duas usando amostras digeridas (GBW 09101 cabelo humano e NIST 8414 músculo bovino) sem tratamento de pré-concentração e

intencionalmente escolhidas, e uma curva em meio aquoso contendo Cd  $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$  e diidrogenofosfato de amônio, adicionado paralelamente, como modificador químico. Os comportamentos das curvas de pirólise das amostras evidenciaram que a presença de fósforo permite maior estabilidade térmica. A amostra GBW 09101 contém pequena quantidade de fósforo, cerca de  $184 \mu\text{g g}^{-1}$ , ao passo que a NIST 8414 contém cerca de  $12 \text{ mg g}^{-1}$  (estes valores são informados). Na amostra de cabelo, com pouco fósforo, a temperatura máxima de  $500^\circ\text{C}$  foi alcançada. Com a amostra de músculo foi possível chegar até a temperatura de  $700^\circ\text{C}$  sem perda do analito. Para a solução aquosa estudada com a adição de modificador fosfato pode-se verificar que o sinal se mantém até a temperatura de  $800^\circ\text{C}$ . Além das curvas descritas, fez-se também o estudo do comportamento do Cd com metanol e com Triton X-114, separadamente. Entretanto não houve estabilização significativa do analito nestes meios, o que permite concluir que a estabilidade térmica mostrada pelos extratos não se deve ao metanol ou ao surfactante. O estudo de estabilidade foi realizado para Cd podendo ser estendido também para Pb. Enfim, os resultados encontrados sugerem que a estabilidade térmica mostrada pelos analitos nos extratos provém de uma possível interação entre os elementos e o ligante, no caso DDTP, associada à presença de fósforo nas amostras, que age como modificador químico. Com isso, fica evidenciada a não necessidade da adição de um modificador químico, o que simplifica o processo. Nos padrões de calibração, a estabilidade apresentada deve-se essencialmente à interação entre o ligante e os analitos.

#### **4.2. Condições de Complexação**

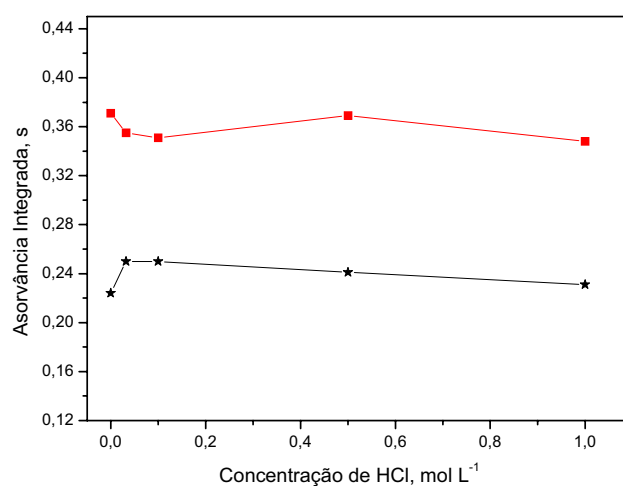
O efeito da concentração de DDTP no sinal de cada analito é mostrado na Figura 6. Para ambos elementos estudados, a absorvância integrada permaneceu praticamente constante para concentrações de DDTP superiores a  $0,5 \text{ \% m/v}$ , independentemente do tipo de amostra em análise; portanto, esta concentração foi utilizada em todas as determinações subseqüentes.





**Figura 6.** Influência da concentração de DDTP na absorvância integrada de Cd (—★—) e Pb (—■—) em BCR 397 (cabelo humano), após a extração no ponto nuvem. Triton X-114 0,1 % v/v, HCl 0,32 mol L<sup>-1</sup>.

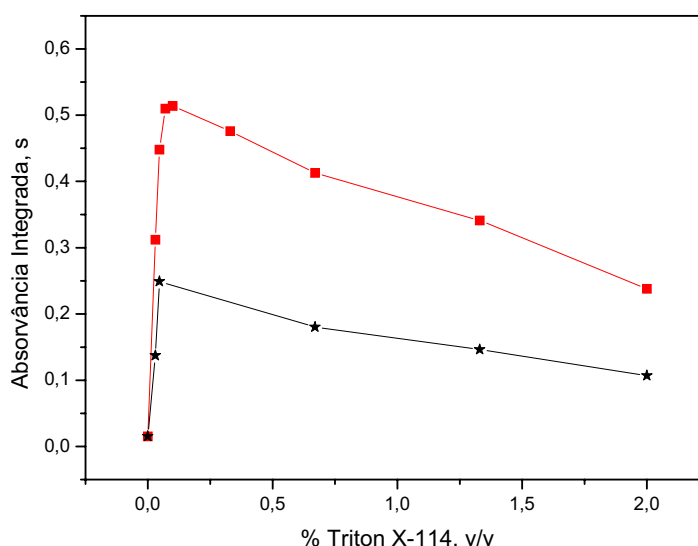
A concentração de HCl foi otimizada pela análise da variação do sinal de absorvância integrada para os dois elementos com uma faixa de concentração de até 1,0 mol L<sup>-1</sup> de HCl, na solução final em 15 mL, resultando nas curvas da Figura 7.



**Figura 7.** Influência da concentração de HCl na absorvância integrada de Cd (—★—) e Pb (—■—) em BCR 397 (cabelo humano) após a extração no ponto nuvem. DDTP 0,5 % m/v, Triton X-114 0,1 % v/v.

Embora a formação de complexos entre Cd e Pb com DDTP ocorra em meio ácido, o comportamento do sinal mostrou-se praticamente independente da concentração de HCl na faixa estudada. Para assegurar uma eficiente extração dos analitos evitando a precipitação ou adsorção destes nas paredes dos tubos, optou-se por trabalhar com a concentração de  $0,32 \text{ mol L}^{-1}$  em todo o trabalho, conforme adotado previamente.<sup>29</sup> A concentração de Triton X-114 também foi otimizada, e os resultados podem ser visualizados na Figura 8.

A eficiência de extração é claramente maior quando a concentração de 0,1 % v/v é empregada; esta concentração foi, portanto, selecionada para os procedimentos subseqüentes.



**Figura 8.** Influência da concentração de Triton X-114 na absorvância integrada de Cd (—★—) e Pb (—■—) em BCR 397 (cabelo humano) após a extração no ponto nuvem. DDTP 0,5 % m/v, HCl  $0,32 \text{ mol L}^{-1}$ .

A Figura 8 mostra um considerável decréscimo no sinal de absorvância integrada com o aumento da concentração de surfactante, uma vez que este aumento representa aumento no volume da fase rica em surfactante que é obtida após centrifugação, ou seja, o analito no extrato é mais diluído, resultando em perda de sensibilidade. Dessa forma, uma extração potencialmente mais efetiva com volumes maiores do surfactante é

compensada e ultrapassada pelo efeito de diluição. Este estudo foi feito para Cd e Pb, e pode-se observar que o efeito de diluição é, obviamente, independente do analito.

#### 4.3 Parâmetros de mérito e resultados

Os parâmetros de mérito encontram-se expostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Limites de detecção (LOD), fator de enriquecimento (EF), coeficiente de correlação (r) e sensibilidade (slope) da curva de calibração para o método proposto.

Analito	LOD / ng g <sup>-1</sup>	EF	r	Slope
				s(μg L <sup>-1</sup> ) <sup>-1</sup>
Cd	6	129	0,99661	2,69
Pb	40	18	0,99360	0,14

O fator de enriquecimento foi calculado através da razão entre a inclinação da curva estabelecida usando padrões aquosos submetidos ao procedimento de extração no ponto nuvem e da curva estabelecida usando padrões aquosos sem pré-concentração. Cádmio obteve notavelmente um alto fator de enriquecimento; este fato pode ser explicado pela teoria de Pearson, uma vez que o DDTP é uma base mole e Cd é um ácido mole, resultando em uma maior afinidade entre eles. Sendo assim, a reação entre Cd e DDTP deve ser mais favorável que a reação entre DDTP e Pb, que é um ácido intermediário<sup>29</sup>. Os limites de detecção (LOD, 3σ<sub>B</sub>) foram obtidos ao nível de ng g<sup>-1</sup> para ambos os analitos, os quais podem ser considerados muito baixos considerando a diluição empregada no procedimento de abertura e preparo de amostras. De fato, extração no ponto nuvem compensa eficientemente o efeito da diluição, devido ao alto fator de enriquecimento que pode ser obtido, especialmente para Cd. A calibração foi realizada com amostras aquosas submetidas ao procedimento de extração no ponto nuvem, apresentando resultados satisfatoriamente acurados, com baixos desvios em relação aos valores certificados para as cinco amostras biológicas analisadas como pode ser verificado na Tabela 4. De fato, os valores obtidos e os certificados estão

em concordância para um nível de confiança de 95% (t-student aplicado). Os desvios padrões relativos, que indicam a precisão obtida, foram menores do que 8,0 %. Bons coeficientes de correlação ( $> 0,99$ ) foram obtidos para ambos elementos.

**Tabela 4.** Concentrações ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) obtidas para Cd e Pb nas amostras certificadas submetidas à extração no ponto nuvem ( $n = 5$ , t-student aplicado para 95% de nível de confiança).

Amostras	Cd		Pb	
	Certificado	Encontrado	Certificado	Encontrado
CRM 278 R	$0,348 \pm 0,007$	$0,353 \pm 0,01$	$2,00 \pm 0,04$	$2,08 \pm 0,03$
BCR 397	$0,521 \pm 0,024$	$0,530 \pm 0,035$	$33,0 \pm 1,2$	$33,0 \pm 0,4$
NIST 8414	$0,013 \pm 0,011$	$0,016 \pm 0,003$	$0,38 \pm 0,24$	$0,28 \pm 0,01$
BCR 186	$2,71 \pm 0,15$	$2,61 \pm 0,03$	$0,306 \pm 0,011$	$0,306 \pm 0,010$
GBW 09101	$0,095 \pm 0,012$	$0,106 \pm 0,003$	$7,2 \pm 0,7$	$6,6 \pm 0,1$

## 5. Conclusão

O procedimento de extração no ponto nuvem usando como surfactante Triton X-114 e como complexante DDTP mostrou ser versátil e simples para a pré-concentração de Cd e Pb e sua posterior determinação por ET AAS em amostras biológicas submetidas à digestão ácida em microondas. A separação de fases ocorre em temperatura relativamente baixa, 25-30 °C, e há alta eficiência de complexação, resultando em altos fatores de enriquecimento e, conseqüentemente, baixos limites de detecção. O uso de modificadores químicos mostrou ser desnecessário, uma vez o fósforo naturalmente presente nas amostras e o DDTP adicionado atuaram de maneira a estabilizar significativamente os metais em questão, permitindo uma temperatura máxima de pirólise de 800 °C para ambos. Este procedimento certamente pode ser estendido a outros materiais biológicos após procedimento de digestão e também a outros elementos que formem complexos com DDTP.

## Referências

1. J. L. MANZOORI; A. BAVILI-TABRIZI.; Cloud point preconcentration and flame atomic absorption spectrometric determination of Cd and Pb in human hair, **Anal. Chim. Acta**, 470, 2002, p. 215-221.
2. B. L. CARSON; H. V. ELLIS III; J. L. Mc CANN; Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans, ed. B. L. Carson, H. V. Ellis III and J. L. Mc Cann, Lewis Publishers, Chelsea, UK, 1986, 51-57.
3. BERMEJO-BARRERA, P.; MOREDA-PIÑEIRO, A.; MOREDA-PIÑEIRO, J.; BERMEJO-BARRERA, A.; Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Lead, Cadmium and Manganese in human hair samples using rapid atomizer programs, **J. Anal. At. Spectrom.** 12, 1997, p. 301-306.
4. KUBOVÁ, J.; HANÁKOVÁ, V.; MEDVED', J.; STRESKO, V.; Determination of lead and cadmium in human hair by atomic absorption spectrometric procedures after solid phase extraction, **Anal. Chim. Acta**, 337, 1997, p. 329-334.
5. G. H. TAO; Z. L. FANG; Dual stage preconcentration system for flame atomic absorption spectrometry using flow injection on-line ion-exchange

followed by solvent extraction, **Fresenius J. Anal. Chem.**, 360, 1998, p. 156.

6. C. SHUYU, Z. ZHIFENG; Y. HUAMING; Dithizone as chelator in the flow injection separation and pre-concentration system of trace metals in biological samples, **Anal. Chim. Acta**, 451, 2002, p. 305-311.
7. J. L. MANZOORI; G. KARIM- NEZHAD; Development of a cloud point extraction and preconcentration method for Cd and Ni prior to flame atomic absorption spectrometric determination, **Anal. Chim. Acta** ,2004.
8. O. LINDQVIST; Environmental impact of mercury and other heavy metals, **J. Power Sources**, 1995, 57, p. 3.
9. M. A. M. DA SILVA; Determinação de elementos traço por AAS e ICP-MS após extração no ponto nuvem, usando dietil-ditiofosfato como agente quelante, **Tese de Doutorado**, UFSC, 1998.
10. B. MORENO CORDERO, J. L. PÉREZ PÁVON e J. H. MÉNDEZ; Detection of slightly soluble systems by means of organized media in flow-injection analysis, **Anal. Chim. Acta.**, 1990, 234, p.239-245.
11. G. L. McINTIRE, Micelles in analytical chemistry, **Crit. Rev. Anal. Chem.**, 1990, 21, p.257-278.

12. E. PRAMAURO e E. PELLIZZETTI; The effect of surface-active compounds on chemical processes occurring in aquatic environments, **Coll. Surf.**, 1990, 48, p. 193.
13. M. A. M. DA SILVA, V. L. A. FRESCURA, A. J. CURTIUS, Determination of noble metals in biological samples by electrothermal vaporization inductively coupled plasma mass spectrometry, following cloud point extraction, **Spectrochim. Acta Part B** 56, 2001, p. 1941-1949.
14. F. H. QUINA, W.L. HINZE, Surfactant- mediated cloud point extractions: An environmental benign alternative separation approach, **Ind. Eng. Chem. Res.** 38, 1999, p. 4150-4168.
15. E. PRAMAURO, A.B. PREVOT, Solubilization in micellar systems. Analytical and environmental applications, **Pure Appl. Chem.** 67, 1995, p. 551-559.
16. R. FERRER, J.L. BELTRAN, J. GUITERASS, Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming, **Anal. Chim. Acta**, 330, 1996, p.199-206.
17. C. GARCÍA PINTO, J.L. PÉREZ PAVÓN, B. MORENO CORDERO, Cloud point preconcentration and high-performance liquid-chromatographic



- determination of organophosphorous pesticides with dual electrochemical detection, **Anal. Chem.** 67, 1995, p. 2606-2612.
18. R.P. FRANKEWICH, W.L. HINZE, Evaluation and optimization of the factors affecting non-ionic surfactant-mediated phase separations, **Anal. Chem.** 66, 1994, p. 944-954.
  19. S. R. SIRIMANNE, D.G. PATTERSON, L. Ma, J. B. JUSTICE, Application of cloud point extraction-reverse-phase high-performance liquid chromatography- a preliminary study of the extraction and quantification of vitamins A and E in human serum and whole blood, **J. Chromatogr. B** 716, 1998, 129-137.
  20. M. D. RUKHADZE, S. K. TSAGARELI, N. S. SIDAMONIDZE, V. R. MEYER, Clou-point extraction for the determination of free fraction of antiepileptic drugs in blood plasma and saliva, **Anal. Biochem.** 287 (2000) 279-283.
  21. T. SAITHO, W. L. HINZE, Use of surfactant-mediated phase separation (cloud point extraction) with affinity ligands for the extraction of hydrophilic proteins, **Talanta** 42 (1995) 119-127.
  22. E. EVDOKIMOV, R. WANDRUSKA, Decontamination of DDT-polluted soil by washing cloud point extraction, **Anal. Lett.** 31(1998) 2289-2298.

23. M. A. M. DA SILVA; V. L. A. FRESCURA; A. J. CURTIUS; Determination of trace elements in water samples by ultrasonic nebulization inductively coupled plasma mass spectrometry after cloud point extraction. **Spectrochim. Acta Part B**, 55, 2000, p. 803-813.
24. Z. S. FERRERA; C. P. SANZ; C. M. SANTANA, J. J. S. RDRÍGUEZ; The use of micellar systems in the extraction and pre-concentration of organic pollutants in environmental samples, **Trends in Anal. Chem.**, 23, 7, 2004, p. 479-489.
25. J. CHEN, K. C. TEO, Determination of cadmium, copper, lead and zinc in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, **Anal. Chim. Acta**, 450, 2001, p. 215-222.
26. J. CHEN, K. C. TEO, Determination of cobalt and nickel in water samples by flame atomic absorption spectrometry after cloud point extraction, **Anal. Chim. Acta**, 434, 2001, p. 325-330.
27. E. K. PALEOLOGOS, D.L.GIOKAS, S. M. TZOUWARA-KARAYANNI, M.I. Karayannis, Micelle-mediated methodology for the determination of free and bound iron in wines by flame atomic absorption spectrometry, **Anal. Chim. Acta**, 458, 2002, p. 241-248.
28. M.O. LUCONI, M. F. SILVA, R. A. OLSINA, L. P. FERNÁNDEZ, Cloud point extraction of lead in saliva via use of nonionic PONPE 7.5 without added chelating agents. **Talanta**, 51, 2000, p. 123-129.

29. D. L. G. BORGES, M. A. M. S. DA VEIGA, V. L. A. FRESCURA, B. WELZ and A. CURTIUS, Cloud point extration for the determination of Cd, Pb and Pd in blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, using Ir or Ru as permanent modifiers, **J. Anal. At. Spectrom.**, 2003,18, 501-507.
30. B. WELZ, Electrothermal Atomization, In: B. Welz, M. Sperling, **Atomic Absorption Spectrometry**, Wiley, Weinheim, 1999, p. 170-190.